

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許出願公告番号

特公平7-84481

(24) (44) 公告日 平成7年(1995)9月13日

|                            |      |         |     |        |
|----------------------------|------|---------|-----|--------|
| (51) Int. Cl. <sup>8</sup> | 識別記号 | 庁内整理番号  | F I | 技術表示箇所 |
| C 0 8 B 15/00              |      | 7433-4C |     |        |
| A 6 1 K 47/36              | B    |         |     |        |

請求項の数15(全 23 頁)

|               |                         |          |  |
|---------------|-------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号     | 特願平4-504624             | (71) 出願人 | 999999999<br>株式会社デイ・デイ・エス研究所<br>東京都渋谷区渋谷2丁目17番5号 |
| (86) (22) 出願日 | 平成4年(1992)2月21日         | (72) 発明者 | 井上 和私<br>千葉県船橋市松ヶ丘5-6-6                          |
| (86) 国際出願番号   | PCT/J P 9 2 / 0 0 1 8 4 | (72) 発明者 | 伊藤 照臣<br>千葉県松戸市新松戸6-89-104                       |
| (87) 国際公開番号   | W O 9 2 / 1 4 7 5 9     | (72) 発明者 | 川口 隆行<br>東京都豊島区巣鴨1-15-2-406                      |
| (87) 国際公開日    | 平成4年(1992)9月3日          | (72) 発明者 | 青野 勝利<br>奈良県奈良市学園朝日元町2-529-3<br>B-308            |
| (31) 優先権主張番号  | 特願平3-27544              | (72) 発明者 | 奥野 哲<br>埼玉県三郷市早稲田8-5-18                          |
| (32) 優先日      | 平3(1991)2月21日           | (74) 代理人 | 井理士 佐藤 一雄 (外2名)                                  |
| (33) 優先権主張国   | 日本 (J P)                | 審査官      | 弘実 謙二  |
| (31) 優先権主張番号  | 特願平3-360395             |          |  |
| (32) 優先日      | 平3(1991)12月27日          |          |  |
| (33) 優先権主張国   | 日本 (J P)                |          |  |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カルボキシメチルマンノグルカン及びその誘導体

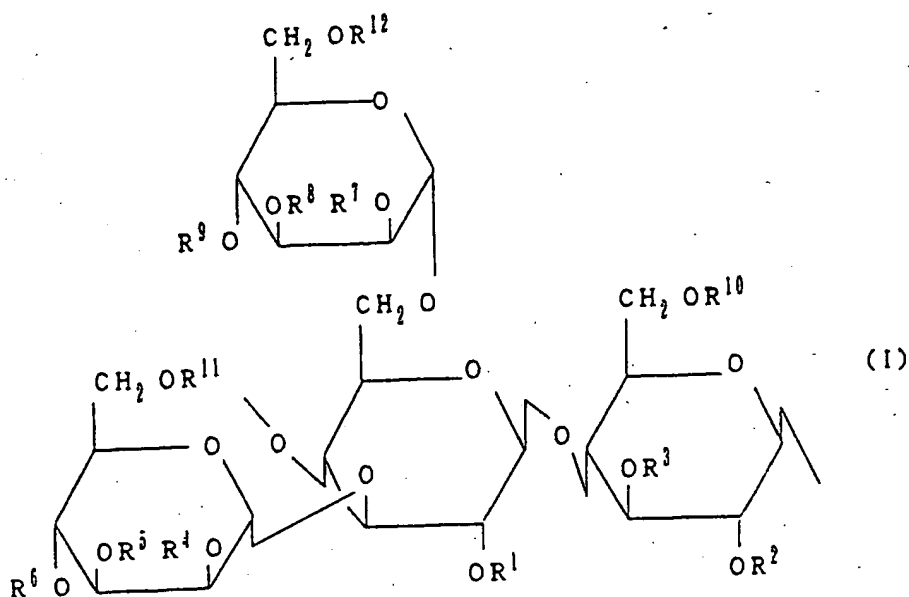
1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の一般式 (I) で表わされるテトラサ

2

ッカライド単位から構成される、カルボキシメチルマンノグルカン及びその塩。



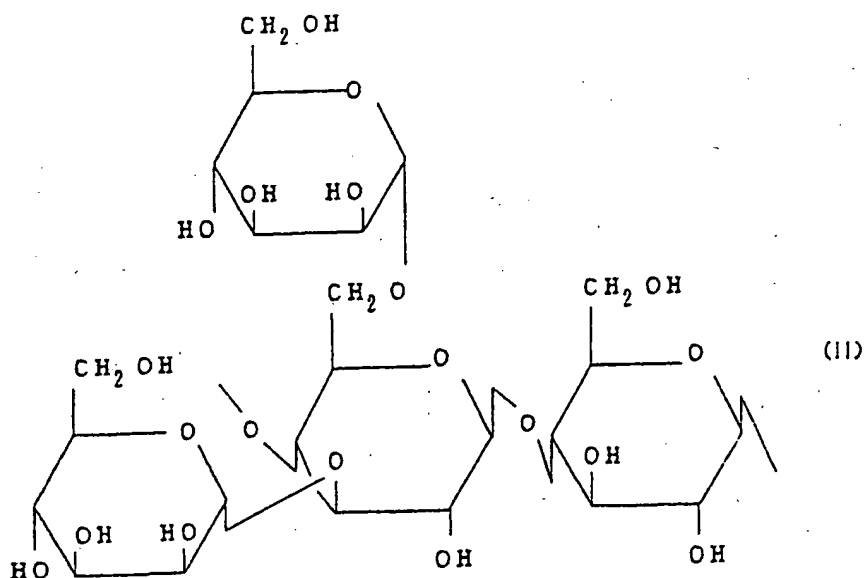
(式中、  
R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、R10、R11及OR  
12は、同一又は異なってもよく、それぞれ水素原子  
又はCH<sub>2</sub>COOHを表わす。)

【請求項2】分子量が1万～200万である、請求項1記  
載のカルボキシメチルマンノグルカン。

【請求項3】一糖残基あたりのカルボキシメチル基の数\*

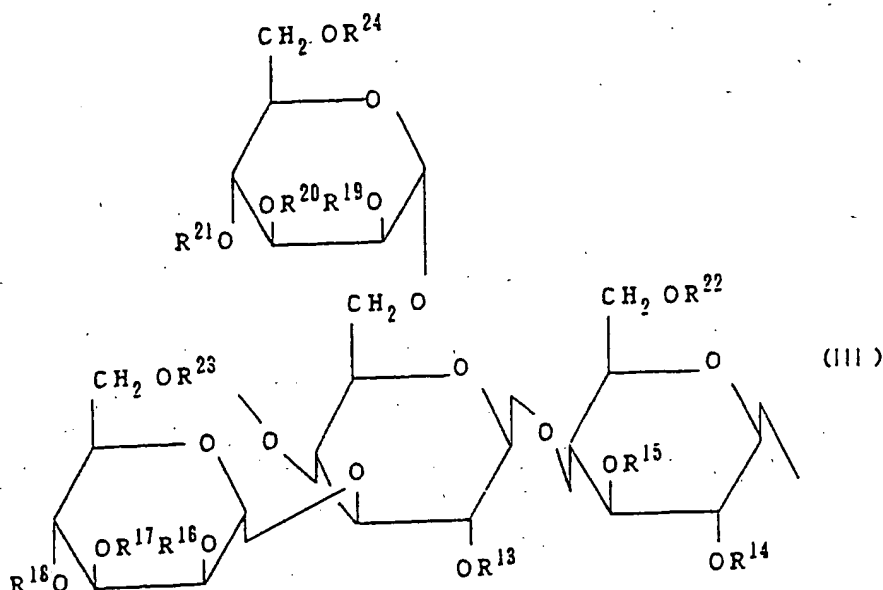
\*として定義される置換度が0.01～3.0である、請求項1  
又は2記載のカルボキシメチルマンノグルカン。

【請求項4】下記式(II)で表わされるテトラサッカラ  
イド単位から構成されるマンノグルカンにハロゲン化酢  
酸を反応させることからの、請求項1～3のいずれか  
1項記載のカルボキシメチルマンノグルカンの製造法。



【請求項5】下記的一般式(III)で表わされるテトラ  
サッカライド単位から構成される、カルボキシメチルマ

ノグルカン誘導体及びその塩。



(式中、  
 $R_{13}$ ,  $R_{14}$ ,  $R_{15}$ ,  $R_{16}$ ,  $R_{17}$ ,  $R_{18}$ ,  $R_{19}$ ,  $R_{20}$ ,  $R_{21}$ ,  $R_{22}$ ,  $R_{23}$ 及び $R_{24}$ は、水素原子、 $\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $\text{CH}_2\text{CONR}^*1\text{R}^*2$  (ここで $\text{NR}^*1\text{R}^*2$ は、一般式 $\text{HNR}^*1\text{R}^*2$ で表わされるアミノ基を有する医薬化合物のアミノ基から水素原子を一個除いた残基を表わす)、 $\text{CH}_2\text{COOR}^*3$  (ここで $\text{OR}^*3$ は、一般式 $\text{HOR}^*3$ で表わされるアルコール性水酸基を有する医薬化合物のアルコール性水酸基から水素原子を除いた残基を表わす)、又は $\text{CH}_2\text{COO} \cdot 1/2 [\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]$  (ここでPtは二価の白金を表す)を表わす。

ただし、分子中の少なくとも1つの $R_{13} \sim R_{24}$ は $\text{CH}_2\text{CONR}^*1\text{R}^*2$ 、 $\text{CH}_2\text{COOR}^*3$ 又は $\text{CH}_2\text{COO} \cdot 1/2 [\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]$ を表わす。)

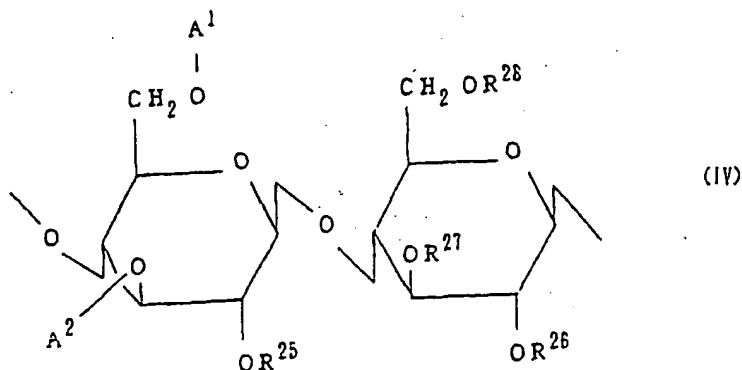
【請求項6】分子量が1万～200万である、請求項5記 \*

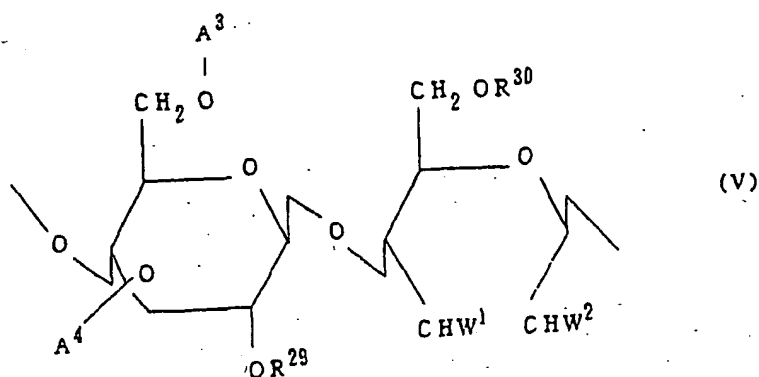
\* 載のカルボキシメチルマンノグルカン誘導体及びその塩。

【請求項7】一糖残基あたりのカルボキシメチル基の数として定義される置換度が0.01～3.0である、請求項5又は6記載のカルボキシメチルマンノグルカン誘導体及びその塩。

【請求項8】請求項1記載の化合物又はその塩に、 $\text{HNR}^*1\text{R}^*2$ 、 $\text{HOR}^*3$ 又は $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{NO}_3)_2$ を反応させることからなる、請求項5～7のいずれか一項記載のカルボキシメチルマンノグルカン誘導体及びその塩の製造法。

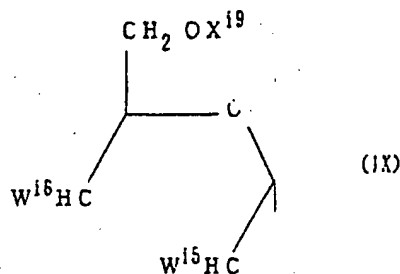
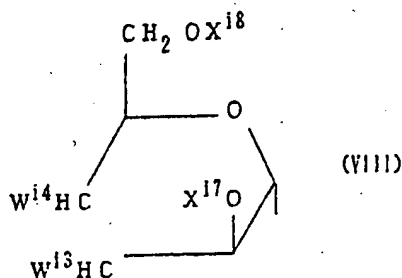
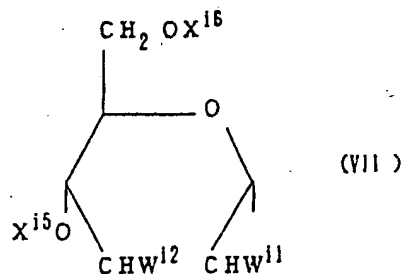
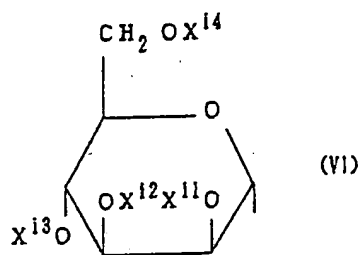
【請求項9】下記的一般式(IV)で表わされる単位及び／又は下記的一般式(V)で表わされる単位から構成される、酸化カルボキシメチルマンノグルカン及びその誘導体並びにその塩。





〔式中、  
R25、R26、R27、R28、R29及びR30は、同一又は異なっ  
ていてもよく、それぞれ水素原子又はCH<sub>2</sub>COOHを表わし、  
W1及びW2はそれぞれ=O又は=N-R\*4（ここでRは  
一般式H<sub>2</sub>N-R\*4で表わされるアミノ基を有する医薬  
化合物のアミノ基から水素原子を二個除いた残基を表わ  
す）を表わし、  
A1及びA2は、同一又は異なっ

\*記式 (VI)、式 (VII)、式 (VIII) 又は式 (IX) を表  
わし、  
A3及びA4は、同一又は異なっ  
ていてもよく、それぞれ下  
記式 (VI)、式 (VII)、式 (VIII) 又は式 (IX) を表  
わすが、  
ただし、分子が前記一般式 (IV) のみからなる場合、分  
子中のA1及びA2の全てが式 (VI) を表わすことはない。



(ここで、  
Xi1、Xi2、Xi3、Xi4、Xi5、Xi6、Xi7、Xi8及びXi9は、  
同一又は異なっ  
ていてもよく、それぞれ水素原子又はCH  
2COOHを表わし、  
Wi1、Wi2、Wi3、Wi4、Wi5及びWi6は同一又は異なっ  
ていてもよく、それぞれ=O又は=N-R\*4（ここでN-  
R\*4は一般式H<sub>2</sub>N-R\*4で表わされるアミノ基を有  
する医薬化合物のアミノ基から水素原子を二個除いた残  
基を表わす）を表わすが、

ただし、式 (VI)、式 (VII)、式 (VIII) 及び式 (I  
X) のそれぞれにおいてXi1~Xi9及びWi1~Wi6の添字 i  
は1~4の整数を表わし、A1、A2、A3及びA4のそれぞれ  
を一般にAiと記すものとする。)

【請求項10】分子量が1万~200万である、請求項9  
記載の酸化カルボキシメチルマンノグルカン及びその誘  
導体並びにその塩。

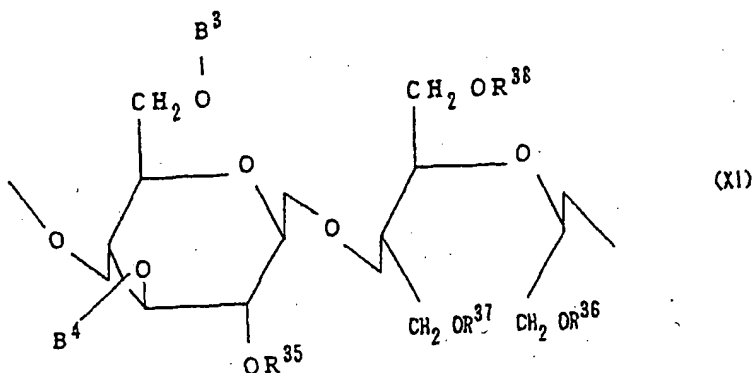
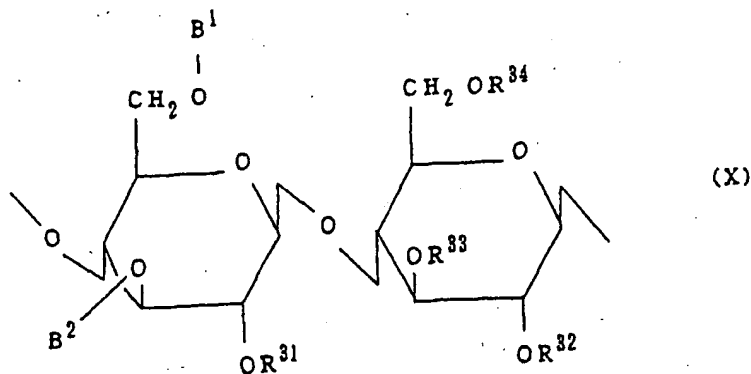
【請求項11】一糖残基あたりのカルボキシメチル基の  
50 数として定義される置換度が0.01~3.0である、請求項

9又は10記載の酸化カルボキシメチルマンノグルカン及びその誘導体並びにその塩。

【請求項12】請求項4で定義した式(II)で表わされるテトラサッカライド単位から構成されるマンノグルカンにハロゲン化酢酸を反応させ、続いて過ヨウ素酸又はその塩を反応させることからなる、請求項9~11いずれ\*

\*か一項記載の酸化カルボキシメチルマンノグルカン及びその誘導体並びにその塩の製造法。

【請求項13】下記の一般式(X)で表わされる単位及び/又は下記の一般式(XI)で表わされる単位から構成される、カルボキシメチル開環マンノグルカン及びその誘導体並びにその塩。

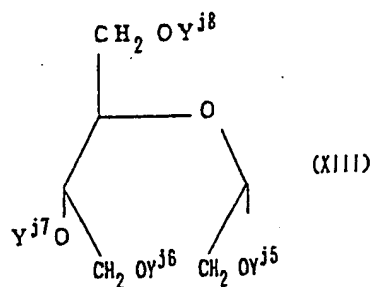
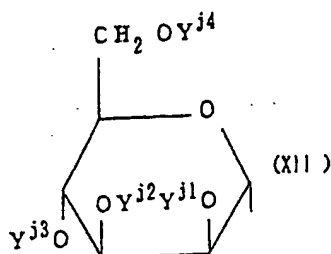


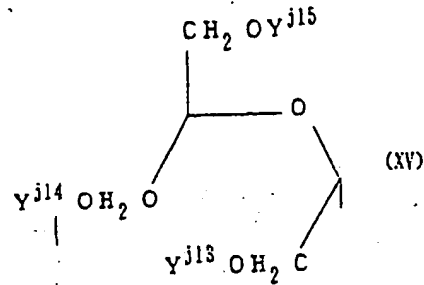
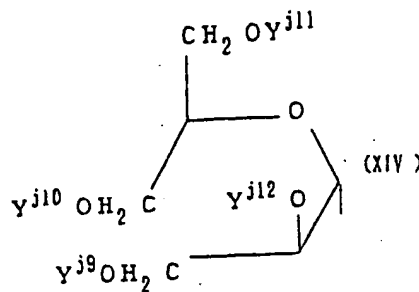
〔式中、

R31、R32、R33、R34、R35、R36、R37及びR38は、同一又は異なってもよく、それぞれ水素原子、CH<sub>2</sub>COOH、CH<sub>2</sub>CONR\*1R\*2、CH<sub>2</sub>COOR\*3（ここでNR\*1R\*2及びOR\*3は請求項5で定義したのと同義である）又はCH<sub>2</sub>COO・1/2 [Pt (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]（ここでPtは二価の白金を表す）を表わし、B<sup>1</sup>及びB<sup>2</sup>は同一又は異なってもよく、それぞれ下記※40

※式(XII)、式(XIII)、式(XIV)又は式(XV)を表わし、

B<sup>3</sup>及びB<sup>4</sup>は同一又は異なってもよく、それぞれ下記式(XIII)、式(XIV)又は式(XV)を表わすが、ただし、分子が前記一般式(X)のみからなる場合、分子中のB<sup>1</sup>及びB<sup>2</sup>の全てが式(XII)を表わすことはない。





(ここで、  
 $\text{Y}^{\text{j1}}$ ,  $\text{Y}^{\text{j2}}$ ,  $\text{Y}^{\text{j3}}$ ,  $\text{Y}^{\text{j4}}$ ,  $\text{Y}^{\text{j5}}$ ,  $\text{Y}^{\text{j6}}$ ,  $\text{Y}^{\text{j7}}$ ,  $\text{Y}^{\text{j8}}$ ,  $\text{Y}^{\text{j9}}$ ,  
 $\text{Y}^{\text{j10}}$ ,  $\text{Y}^{\text{j11}}$ ,  $\text{Y}^{\text{j12}}$ ,  $\text{Y}^{\text{j13}}$ ,  $\text{Y}^{\text{j14}}$ 及び $\text{Y}^{\text{j15}}$ は、同一又は異  
 なっていてもよく、それぞれ水素原子、 $\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $\text{CH}_2\text{CO}$   
 $\text{NR}^*1\text{R}^*2$ 又は $\text{CH}_2\text{COOR}^*3$  (ここで $\text{NR}^*1\text{R}^*2$ 及  
 $\text{Y}^{\text{jOR}^*3}$ は請求項5で定義したのと同義である) または  
 $\text{CH}_2\text{COO} \cdot 1/2 [\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]$  (ここでPtは二価の白金を  
 表す) を表わし、  
 ただし、式 (XII)、式 (XIII)、式 (XIV) 及び式 (X  
 V) のそれぞれにおいて $\text{Y}^{\text{j1}} \sim \text{Y}^{\text{j15}}$ の添字jは1~4の整  
 数を表わし、B<sup>1</sup>、B<sup>2</sup>、B<sup>3</sup>及びB<sup>4</sup>のそれぞれを一般にB<sup>j</sup>と  
 記すものとする。))

【請求項14】分子量が1万~200万である、請求項13  
 記載のカルボキシメチル開環マンノグルカン及びその誘  
 導体並びにその塩。

【請求項15】請求項4で定義した式 (II) で表わされ  
 るテトラサッカライド単位から構成されるマンノグルカ  
 ンに、過ヨウ素酸又はその塩を反応させ、続いて水素化  
 ホウ素ナトリウムを反応させ、更にハロゲン化酢酸を反  
 応させることからなる、請求項13又は14記載のカルボキ  
 シメチル開環マンノグルカン及びその誘導体並びにその  
 塩の製造法。

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

【産業上の利用分野】

本発明は新規なカルボキシメチルマンノグルカン及びそ  
 の誘導体並びにその塩に関する。更に詳しくは、医薬品  
 の血中における消失を遅延させ、かつ、該医薬品の癌組  
 織への指向性を高めるために有用な担体としてのカルボ  
 キシメチルマンノグルカン及びその誘導体並びにその塩  
 に関する。

【従来の技術】

水溶性高分子を薬物担体として使用することは、従来か  
 らとりわけ製剤の分野において試みられ、関連する多数  
 の技術が提供されてきた。多くの場合においてそれらに  
 はカルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセ  
 ルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース等のセ

ルロース誘導体を使用され、これらの物質自体の物理化  
 学的性状を、利用して薬物の分散化、徐放化等が意図さ  
 れてきた。しかしこれらの例において薬物は、担体とし  
 てのセルロース誘導体と製剂的な混合によって一体化は  
 しているものの、担体に化学結合してはいない。

ところで、薬物を必要な組織に必要な時に必要な量だけ  
 送達する、いわゆる臓器指向の技術において、水溶性高  
 分子を薬物担体として利用する場合には、単なる混合で  
 はなく、薬物を担体に化学結合させる必要がある。その  
 ような試みとしてはデキストランにマイトマイシンCを  
 結合させること (瀬崎仁：薬学雑誌、109,611-621 (19  
 89))、マンナンにマイトマイシンCを結合させること  
 (第49回日本癌学会総会記事 (1990)、425頁、演題番  
 号2155)、マンナンにブレオマイシンを結合させること  
 (第49回日本癌学会総会記事 (1990)、425頁、演題番  
 号2154) などがなされている。しかし、新規に多糖型水  
 溶性高分子を合成し、これに薬物を化学結合して薬物送  
 達を行う技術について試みは未だ十分な展開がなされて  
 いないのが実状である。

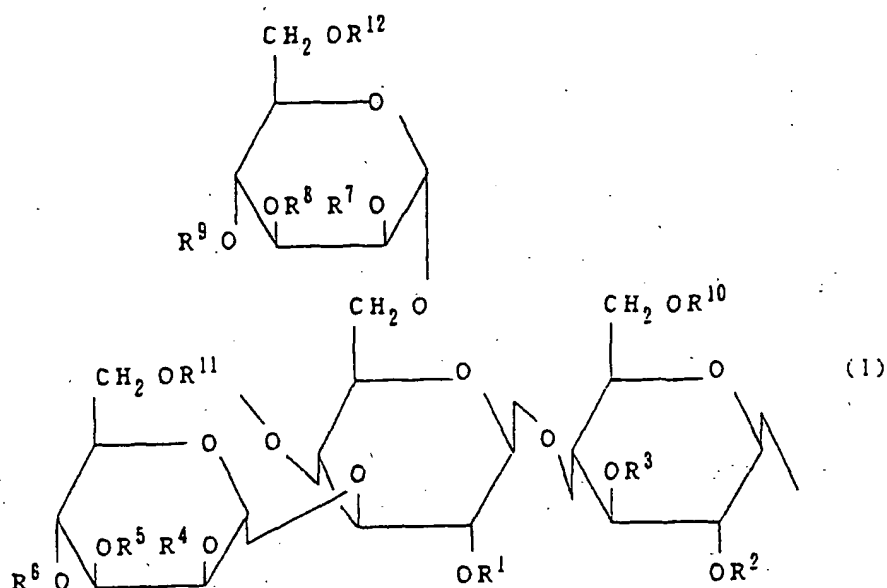
【発明の概要】

上記にかんがみ本発明者はマンノグルカンなる多糖高分  
 子に着目し、これをカルボキシメチル化することを試み  
 たところ、得られた物質は新規な多糖型水溶性高分子で  
 あり、これに薬物を化学結合させて薬物送達を行う技  
 術、特に薬物の血中消失速度を小さくし、癌組織への薬  
 物の移行を高める技術のための担体として有用な物質で  
 あるを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、薬物を化学結合を介して保持し、適  
 切な薬物送達を可能とする多糖型水溶性高分子を提供す  
 ることを目的としている。

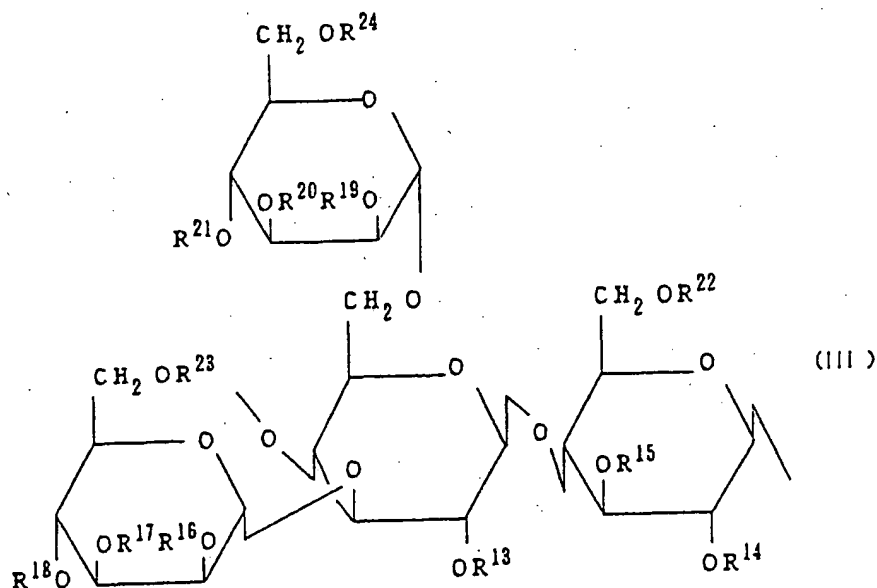
更に本発明は、医薬品の血中における消失を遅延させ、  
 かつ、該医薬品の癌組織への指向性を高めるために有用  
 な多糖型水溶性高分子を提供することを目的としてい  
 る。

本発明の第一の態様によるカルボキシメチルマンノグル  
 カン及びその塩は、下記の一般式 (I) で表わされるテ  
 トラサッカライド単位から構成されるもの、である。



(式中、  
R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、R10、R11及びR12は、同一又は異なってもよく、それぞれ水素原子又はCH<sub>2</sub>COOHを表わす。)

\* また、本発明の第二の態様によるカルボキシメチルマンノグルカン誘導体及びその塩は、下記の一般式 (III) で表わされるテトラサッカライド単位から構成されるもの、である。



(式中、  
R13、R14、R15、R16、R17、R18、R19、R20、R21、R22、R23及びR24は、水素原子、CH<sub>2</sub>COOH、CH<sub>2</sub>CONR\*1R\*2 (ここでNR\*1R\*2は、一般式HNR\*1R\*2で表わされるアミノ基を有する医薬化合物のアミノ基から水素原子を一個除いた残基を表わす)、CH<sub>2</sub>COOR\*3 (こ

でOR\*3は、一般式HOR\*3で表わされるアルコール性水酸基を有する医薬化合物のアルコール性水酸基から水素原子を除いた残基を表わす)、又はCH<sub>2</sub>COO·1/2 [Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (ここでPtは二価の白金を表す) を表わす。

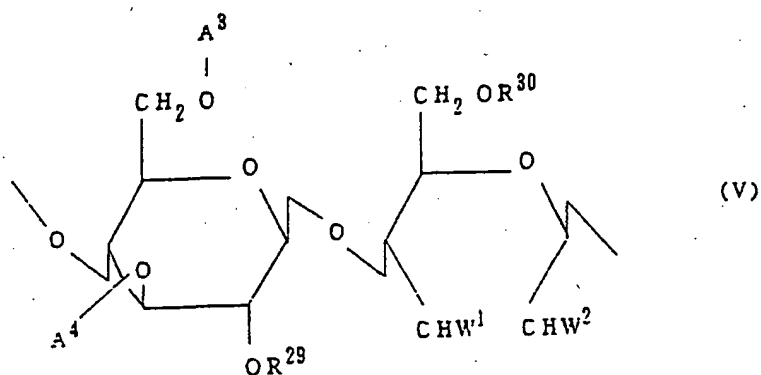
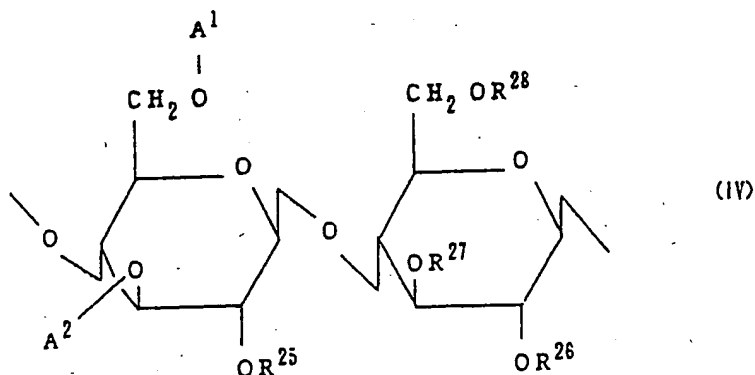
ただし、分子中の少なくとも1つのR13~R24はCH<sub>2</sub>CONR



\* 1 R \* 2、 $\text{CH}_2\text{COOR}^* 3$  又は  $\text{CH}_2\text{COO} \cdot 1/2 [\text{Pt} (\text{NH}_3)_2]$  を表わす。)

更に、本発明の第三の態様による酸化カルボキシメチル\*

\* マンノグルカン及びその誘導体並びにその塩は、下記の一般式 (IV) で表わされる単位及び/又は下記の一般式 (V) で表わされる単位から構成されるもの、である。

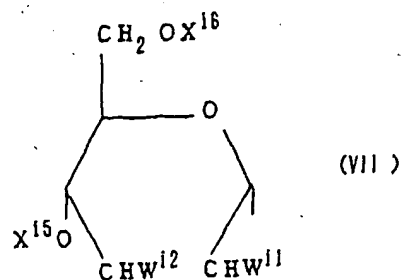
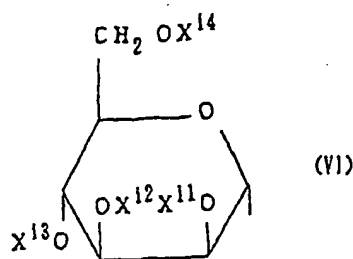


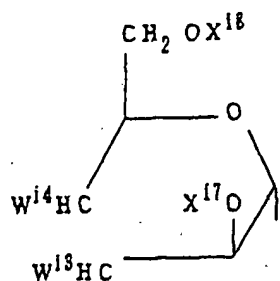
〔式中、  
R25、R26、R27、R28、R29及びR30は、同一又は異なってもよく、それぞれ水素原子又は $\text{CH}_2\text{COOH}$ を表わし、  
W1及びW2はそれぞれ=O又は=N-R\*4 (ここでRは一般式 $\text{H}_2\text{N}-\text{R}^* 4$ で表わされるアミノ基を有する医薬化合物のアミノ基から水素原子を二個除いた残基を表わす)を表わし、

30※A1及びA2は、同一又は異なってもよく、それぞれ下記式 (VI)、式 (VII)、式 (VIII) 又は式 (IX) を表わし、

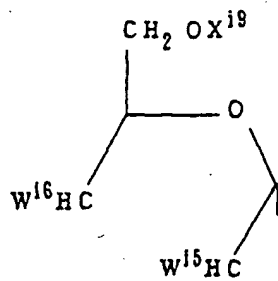
A3及びA4は、同一又は異なってもよく、それぞれ下記式 (VII)、式 (VIII) 又は式 (IX) を表わすが、ただし、分子が前記一般式 (IV) のみからなる場合、分子中のA1及びA2の全てが式 (VI) を表わすことはない。

※





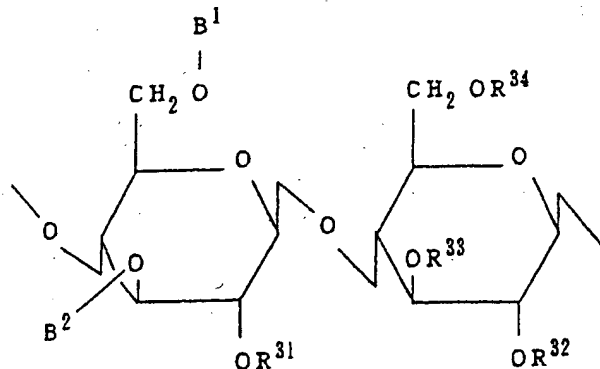
(VIII)



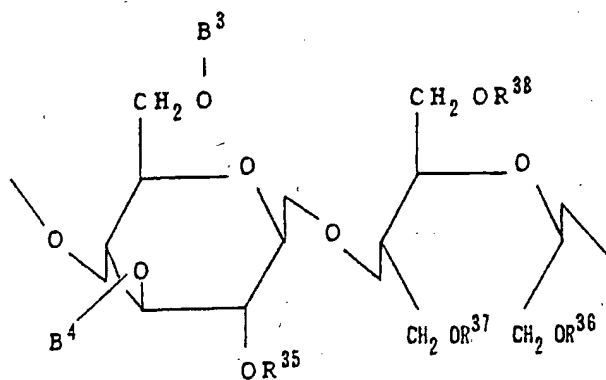
(IX)

(ここで、  
 $X_{i1}, X_{i2}, X_{i3}, X_{i4}, X_{i5}, X_{i6}, X_{i7}, X_{i8}$ 及び $X_{i9}$ は、  
 同一又は異なっているもよく、それぞれ水素原子又は $CH_2COOH$ を表わし、  
 $W_{i1}, W_{i2}, W_{i3}, W_{i4}, W_{i5}$ 及び $W_{i6}$ は同一又は異なっているもよく、それぞれ $=O$ 又は $=N-R^*4$  (ここで $N-R^*4$ は一般式 $H_2N-R^*4$ で表わされるアミノ基を有する医薬化合物のアミノ基から水素原子を二個除いた残基を表わす)を表わすが、

\*ただし、式 (VI)、式 (VII)、式 (VIII) 及び式 (IX) のそれぞれにおいて $X_{i1} \sim X_{i9}$ 及び $W_{i1} \sim W_{i6}$ の添字  $i$  は1~4の整数を表わし、 $A^1, A^2, A^3$ 及び $A^4$ のそれぞれを一般に $A^i$ と記すものとする。) ]  
 また更に、本発明による第四の態様によるカルボキシメチル開環マンノグルカン及びその誘導体並びにその塩は、下記の一般式 (X) で表わされる単位及び/又は下記の一般式 (XI) で表わされる単位から構成されるものである。



(X)



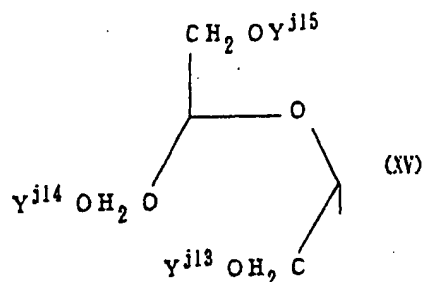
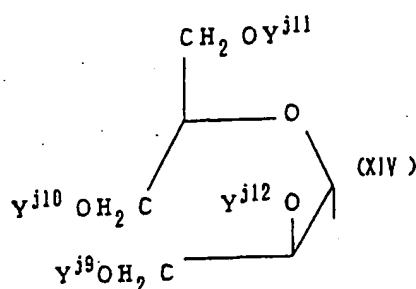
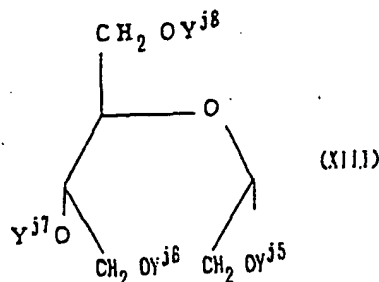
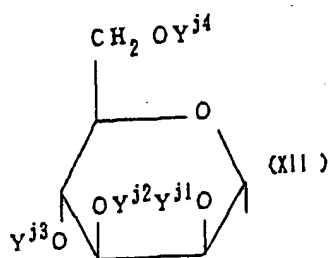
(XI)

〔式中、  
 $R_{31}, R_{32}, R_{33}, R_{34}, R_{35}, R_{36}, R_{37}$ 及び $R_{38}$ は、同一又は異なっているもよく、それぞれ水素原子、 $CH_2COOH$ 、 $C_6H_5CONR^*1R^*2$ 、 $CH_2COOR^*3$  (ここで $NR^*1R^*2$ 及び $OR^*3$ は請求項5で定義したのと同義である) 又は

$CH_2COO \cdot 1/2 [Pt(NH_3)_2]$  (ここでPtは二価の白金を表す)を表わし、  
 $B^1$ 及び $B^2$ は同一又は異なっているもよく、それぞれ下記式 (XII)、式 (XIII)、式 (XIV) 又は式 (XV) を表わし、

B<sup>3</sup>及びB<sup>4</sup>は同一又は異なってもよく、それぞれ下記式 (XIII)、式 (XIV) 又は式 (XV) を表わすが、ただし、分子が前記一般式 (X) のみからなる場合、分\*

\*子中のB<sup>1</sup>及びB<sup>2</sup>の全てが式 (XII) を表わすことはない。



(ここで、Yj1、Yj2、Yj3、Yj4、Yj5、Yj6、Yj7、Yj8、Yj9、Yj10、Yj11、Yj12、Yj13、Yj14及びYj15は、同一又は異なってもよく、それぞれ水素原子、CH<sub>2</sub>COOH、CH<sub>2</sub>CONR\*1R\*2又はCH<sub>2</sub>COOR\*3 (ここでNR\*1R\*2及びOR\*3は請求項5で定義したのと同義である) またはCH<sub>2</sub>COO・1/2 [Pt (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (ここでPtは二価の白金を表す) を表わし、ただし、式 (XII)、式 (XIII)、式 (XIV) 及び式 (XV) のそれぞれにおいてYj1~Yj15の添字jは1~4の整数を表わし、B<sup>1</sup>、B<sup>2</sup>、B<sup>3</sup>及びB<sup>4</sup>のそれぞれを一般にBjと記すものとする。)

#### 〔図面の簡単な説明〕

第1図は、Walker256担癌ラットについて18.0μg/Kg投与の場合の血漿中濃度の経時変化を示すグラフである。

第2図は、Walker256担癌ラットについて1mg/Kg投与の場合の血漿中濃度の経時変化を示すグラフである。

第3図は、実施例2で得たシッフ塩基型結合によるカルボキシメチルマンノグルカン-ダウノルビシン複合体の紫外・可視部吸収スペクトルを示す。

第4図は、実施例3で得たアミド結合を介したカルボキシメチルマンノグルカン-ダウノルビシン複合体の紫外・可視部吸収スペクトルを示す。

第5図は、実施例15で得たアミド基を介したカルボキシメチルマンノグルカン-マイトマイシンC複合体の紫外・可視部吸収スペクトルを示す。

第6図は、実施例18で得たアミド基を介したカルボキシ

メチル開環マンノグルカン-マイトマイシンC複合体の紫外・可視部吸収スペクトルを示す。

第7図は、実施例18で得たアミド基を介したカルボキシメチル開環マンノグルカン-マイトマイシンC複合体のゲル濾過クロマトグラムを示す。

第8図は、実施例23で得たシッフ塩基型係合を介した酸化カルボキシメチルマンノグルカン-ダウノルビシン複合体の紫外・可視部吸収スペクトルを示す。

第9図は、実施例24で得たシッフ塩基型係合を介した酸化カルボキシメチルマンノグルカン-ダウノルビシン複合体の紫外・可視部吸収スペクトルを示す。

第10図は、実施例25で得たシッフ塩基型係合を介した酸化カルボキシメチルマンノグルカン-ダウノルビシン複合体の紫外・可視部吸収スペクトルを示す。

第11図は、実施例26で得た配位結合を介したシス-ジアミン白金 (II) 錯体複合体のゲル濾過溶出パターンを示す。

#### 〔発明の具体的説明〕

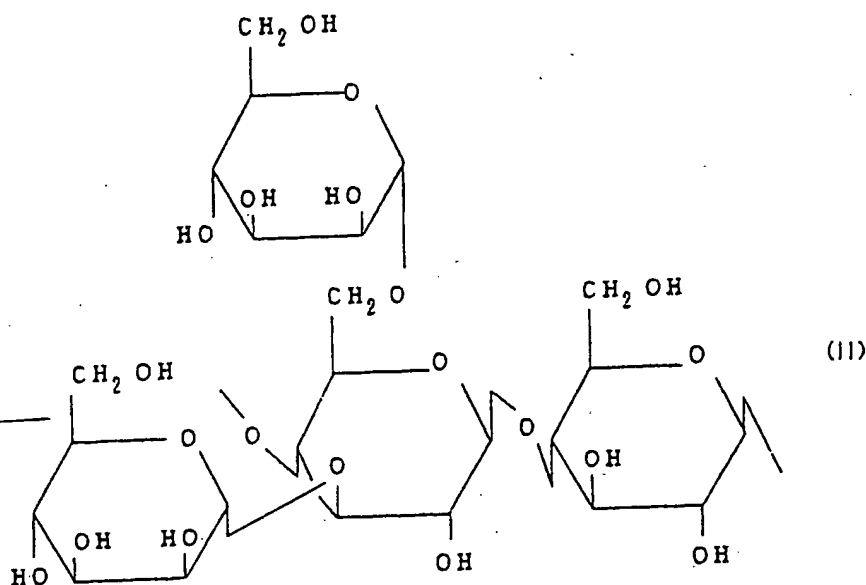
##### 化合物

本発明の第一の態様によるカルボキシメチルマンノグルカンは、前記一般式 (I) で表わされるテトラサッカライド単位から構成されるものである。ここで「テトラサッカライド単位から構成される」とは、本発明によるカルボキシメチルマンノグルカンが当該単位を繰り返し単位とした構造の高分子化合物であることを意味する。

ここで、一般式 (I) で表わされるテトラサッカライド単位は、下記式 (II) で表わされる基本骨格を有する。

従って、本発明によるカルボキシメチルマンノグルカン  
は下記式 (II) で表わされるテトラサッカライド単位が\*

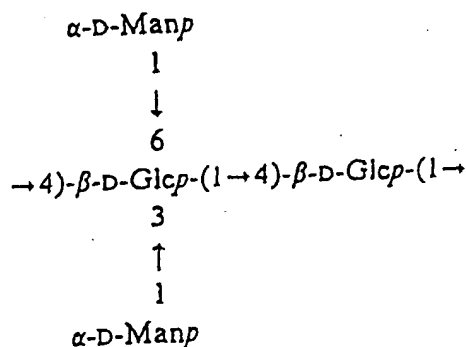
\*ら構成されるポリサッカライドを基本骨格とするものと  
言い換えることができる。



この多糖高分子については本発明者の一人らによってすでに報告されている (Inoue K. et al., Carbohydrate Res. 114, 245-256, (1983))。

この基本骨格たるポリサッカライドはD-マンノ-D-グルカンであり、このポリサッカライドの主鎖はβ (1→4) 結合のセルロースであって、該主鎖を構成するD-グルコース残基の1つおきにその3位及び6位にα-D-マンノシル基がそれぞれα (1→3) 結合及びα (1→6) 結合によって二重分枝した構造を有している。

その構造は前記式 (II) の他に下記式のように表すことができる。



※本発明によるカルボキシメチルマンノグルカンは、前記一般式 (I) で表わされるテトラサッカライド単位から構成されるものである限りその分子量についての限定はされないものであるが、好ましくは  $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$ 、より好ましくは  $1 \times 10^6$  程度である。

本発明によるカルボキシメチルマンノグルカンは、前記基本骨格中の水酸基の水素原子がカルボキシメチル基で置換された構造を有するものと言い換えることができるが、この置換基の導入の割合は、糖残基一つあたりの置換基の数として定義される置換度によって表わすことができる。すなわち、

※

$$\text{置換度} = \frac{\text{分子中の置換基の総数}}{(\text{分子中のテトラサッカライド単位の総数} \times 4)}$$

と表わせる。

50 置換度の上限は全ての水酸基が置換された場合の3であ

るが、本発明において置換度は0.01以上が好ましい。なお、本発明においては分子中に少なくとも1つのカルボキシメチル基が存在していることが必要であり、この意味で置換度が0である化合物は除かれる。各テトラサッカライド単位の構造が前記一般式(I)の範囲内にあれば、隣り合うテトラサッカライド単位においてその置換基の導入位置が同一でも異なってもよいことはいうまでもない。

本発明によるカルボキシメチルマンノグルカンは、その塩として存在することができる。好適な塩の例としてはナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩のようなアルカリ金属またはアルカリ土類金属塩、アルギニン塩、リジン塩のようなアミノ酸塩を挙げることができる。

また本発明の第二の態様によるカルボキシメチルマンノグルカン誘導体は、前記一般式(I)のカルボキシメチルマンノグルカンから誘導される。すなわち、一般式

(III)で表わされる単位から構成されるマンノグルカン誘導体は、一般式(I)において、カルボキシメチル基の一部または全部に酸アミド結合、エステル結合または配位結合を介して医薬化合物を担持した構造を有する。

導入可能な医薬化合物としては、次のようなものが挙げられる。まず、酸アミド結合を介して導入可能なものとして、一般式 $\text{HNR}^*1\text{R}^*2$ で表わされるアミノ基を有する医薬化合物が挙げられ、その具体例としては、ダウノルビシン、ドキソルビシン、マイトマイシンC、ブレオマイシンなどが挙げられる。また、エステル結合を介して導入可能なものとして、一般式 $\text{HOR}^*3$ で表わされるアルコール性水酸基を有する医薬化合物が挙げられ、その具体例としてはシクロシチジン、ピンクリスチン、ビンブラスチン、アドレナリンなどが挙げられる。更に、配位結合を介して導入可能なものとして、シスプラチンなどの白金錯体などが挙げられる。

本発明の第二の態様によるカルボキシメチルマンノグルカン誘導体はその分子量についての限定はないが、好ましくは $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$ 、より好ましくは $1 \times 10^5$ 程度である。カルボキシメチル基の導入の割合、すなわち、置換度の上限はどのような場合にも3未満であり、下限は0を越える。好ましい置換度は1~2程度である。

本発明の第二の態様によるカルボキシメチルマンノグルカン誘導体も、カルボキシメチル基の塩として存在することができる。好適な塩の例としてはナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩のようなアルカリ金属またはアルカリ土類金属塩、アルギニン塩、リジン塩のようなアミノ酸塩を挙げることができる。

更に、本発明の第三の態様による酸化カルボキシメチルマンノグルカン及びその誘導体は、前記一般式(IV)で表わされる単位および/または前記一般式(V)で表わされる単位から構成される。なお、本明細書において「誘導体」とは、なんらかの医薬化合物が化学結合によって

導入されたものを呼ぶ場合にのみ用いるものとする。従って、この第三の態様による酸化カルボキシメチルマンノグルカンは、一般式(I)で表されるカルボキシメチルマンノグルカンを構成するテトラサッカライド単位の一部または全部のマンノースを開裂し、更に主鎖を構成するグルコースのうちマンノースが分枝していないグルコースの一部または全部を開裂することによって得られた、アルデヒド基を開裂末端に有する構造のものであると言える。また、この第三の態様による酸化カルボキシメチルマンノグルカン誘導体は、さらにこの末端アルデヒドにシッフ塩基型結合を介して医薬化合物を導入したものであると言える。

一般式(IV)において、 $A^1$ および $A^2$ は前記式(VI)、式(VII)、式(VIII)または式(IX)を表す。ここで、分子が前記一般式(IV)のみからなりかつ $A^1$ および $A^2$ が

全て式(VI)である場合は除かれる。式(VII)、式(VIII)または式(IX)で表される単位は、それぞれ式(VI)で表されるマンノース残基の2位と3位の間の結合が開裂したもの、3位と4位の間の結合が開裂したもの、また2位と3位の間の結合および3位と4位の間の結合が開裂したものであるといえる。

また、一般式(V)において、 $A^3$ および $A^4$ は前記式(VI)、式(VII)、(VIII)または式(IX)を表す。

また、式(VI)、式(VII)、式(VIII)及び式(IX)のそれぞれにおいて $x_{i1} \sim x_{i9}$ 及び $w_{i1} \sim w_{i6}$ の添字 $i$ は1~4の整数を表わし、 $A^1$ 、 $A^2$ 、 $A^3$ 及び $A^4$ のそれぞれを一般に $A^i$ と記すものとする。このことは、例えば、同一のD-グルコースから分枝している $A^1$ 及び $A^2$ のそれぞれに式(VII)で表される単位が結合している場合、 $x_{i5}$ 、すなわち $x_{15}$ と $x_{25}$ とは独立しており、それぞれが異なっている場合も本発明の範囲に包含されることを意味する。また、分子中で相隣り合う一般式(IV)および/または一般式(V)で表される単位において、 $R^{25} \sim R^{30}$ 及び $A^1 \sim A^4$ 並びに $x_{i1} \sim x_{i9}$ 及び $w_{i1} \sim w_{i6}$ が異なってもよい。

分子中における一般式(IV)と一般式(V)の存在比、さらには式(VI)、式(VII)、式(VIII)及び式(IX)の存在比は特に限定されないが、導入したい薬物の種類や親水性の程度を考慮して決定されてよい。

シッフ塩基型結合を介して導入可能な医薬化合物として、一般式 $\text{H}_2\text{N}-\text{R}^*4$ で表されるアミノ基を有する医薬化合物が挙げられ、その具体例としては、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ブレオマイシンなどが挙げられる。

更に、本発明の第四の態様によるカルボキシメチル開環マンノグルカン及びその誘導体は、前記一般式(X)で表される単位および/または前記一般式(XI)で表される単位から構成される。第四の態様によるカルボキシメチル開環マンノグルカンは、まずマンノグルカンを構成するテトラサッカライド単位の一部又は全部のマンノ-

スを開環し、更に主鎖を構成するグルコースのうちマンノースが分枝していないグルコースの一部または全部を開環して、その開環末端に形成されたヒドロキシメチル基の水素原子の一部または全部をカルボキシメチル基と置換した構造を有するものである。また、この第四の態様によるカルボキシメチル開環マンノグルカン誘導体は、このカルボキシメチル基に、酸アミド結合、エステル結合または配位結合を介して医薬化合物を担持した構造を有するものである。

一般式 (X) において、B<sup>1</sup>およびB<sup>2</sup>は前記式 (XII)、式 (XIII)、式 (XIV) または式 (XV) を表す。ここで、分子が前記一般式 (X) のみからなり、かつB<sup>1</sup>およびB<sup>2</sup>が全て式 (XII) である場合は除かれる。式 (XII I)、式 (XIV) または式 (XV) で表される単位は、それぞれ式 (XII) で表されるマンノース残基の2位と3位

の間の結合が開裂したもの、3位と4位の間の結合が開裂したもの、また2位と3位の間の結合および3位と4位の間の結合が開裂したものであるといえる。

また、一般式 (X) において、B<sup>3</sup>およびB<sup>4</sup>は前記式 (XI II)、式 (XIV) または式 (XV) を表す。ここで、B<sup>3</sup>およびB<sup>4</sup>が式 (XII) を表す場合は除かれる。これはマンノグルカンを酸化により開環しようとする、分枝糖のマンノースが、主鎖を構成するD-グルコースのうちマンノースが分枝していないD-グルコースに優先して酸化開裂を受けることに起因する。

また、式 (XII)、式 (XIII)、式 (XIV) 及び式 (XV) のそれぞれにおいてYj1~Yj15の添字jは1~4の整数を表わし、B<sup>1</sup>、B<sup>2</sup>、B<sup>3</sup>及びB<sup>4</sup>のそれぞれを一般にBjと記すものとする。このことは、例えば、同一のD-グルコースから分枝しているB<sup>1</sup>及びB<sup>2</sup>のそれぞれに式 (XIII) で表される単位が結合している場合、Yj5、すなわちY15とY25とは独立しており、それぞれが異なっている場合も本発明の範囲に包含されることを意味する。また、分子中で相隣り合う一般式 (X) および/または一般式 (XI) で表される単位において、R31~R38及びB<sup>1</sup>~B<sup>4</sup>並びにYj1~Yj15が異なっているもよい。

分子中における一般式 (X) と一般式 (XI) の存在比、さらには式 (XII)、式 (XIII)、式 (XIV) 及び式 (X V) の存在比は特に限定されないが、導入したい薬物の種類や親水性の程度を考慮して決定されてよい。

この第四の態様によるカルボキシメチル開環マンノグルカンは、医薬化合物を導入できるカルボキシメチル基を保持しつつ、かつ本発明による第一の態様のカルボキシメチルマンノグルカンに比例して水溶性が高い点で好ましい。

この第四の態様のカルボキシメチル開環マンノグルカンのカルボキシメチル基の一部または全部に酸アミド結合、エステル結合または配位結合を介して導入可能な医薬化合物としては、前記した第二の態様のマンノグルカン誘導体に導入可能な医薬化合物が挙げられる。

第三の態様である酸化カルボキシメチルマンノグルカン及びその誘導体並びに第四の態様であるカルボキシメチル開環マンノグルカン及びその誘導体は、それぞれ前記定義の単位から構成される限り分子量についての限定はないが、好ましくは $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$ である。

カルボキシメチル基の導入の割合、すなわち置換度の上限はどの様な場合にも3未満であり、下限は0を越える。酸化カルボキシメチルマンノグルカン及びその誘導体の場合、好ましい置換度は0.4~1である。

10 酸化カルボキシメチルマンノグルカン及びその誘導体並びにカルボキシメチル開環マンノグルカン及びその誘導体も共にそれらのカルボキシメチル基の塩として存在することができる。好適な塩の例としては第一の態様および第二の態様のカルボキシメチルマンノグルカンに関して例示したものが挙げられる。

#### 化合物の製造およびその用途

本発明の第一の態様によるカルボキシメチルマンノグルカンは、前記式 (II) で表わされるテトラサッカライド単位から構成されるマンノグルカンの水酸基の水素原子をカルボキシメチル基で置換することにより得ることができる。具体的には、式 (II) で表わされるテトラサッカライド単位から構成されるマンノグルカンに、アルカリの存在下でハロゲン化酢酸またはその塩を反応させることによって得ることができる。例えば原料を水に溶解し、水酸化ナトリウムを加え、これに冷却しながらモノクロル酢酸を加え、室温で約20時間攪拌し、酢酸でpHを約8~9に調整してから、メタノール中に注加して、沈殿を集め、メタノールおよびアセトンで洗浄し、乾燥すればよい。ここでアルカリおよびモノクロル酢酸またはその塩の添加量を変えることによりカルボキシメチル基の置換度を調節することができる。

30 前記した式 (II) で表わされるテトラサッカライド単位から構成されるマンノグルカンは、ミクロエロスポリア (Microellobosporia) 属に属する菌、例えばActinomyces Microellobosporia griseaの培養液からの分離精製物から調製入手することができる (特公平1-52402号公報参照)。

本発明の第一の態様によるカルボキシメチルマンノグルカンは、血中からの消失速度が小さく、癌組織指向性を有している (詳細は後記実験例参照)。一方、本発明によるカルボキシメチルマンノグルカンには多数の水酸基およびカルボキシル基が存在することから、薬物をこれらの官能基を利用して結合させることができる。従って、本発明の第一の態様によるカルボキシメチルマンノグルカンは、薬物を化学結合を介して担持させて薬物送達を行う技術、特に薬物の血中消失速度を小さくし、癌組織への薬物の移行を高める技術において有用な担体となる。

50 本発明によるカルボキシメチルマンノグルカンへの薬物の導入は、薬物の性質に応じた適当な方法を選択するこ

とにより実施することができる。例えば、アミノ基を有した薬物（例えばダウノルビシン、ドキソルビシンなど）の場合、あらかじめ本発明によるカルボキシメチルマンノグルカンを経過ヨウ素酸などで酸化して、マンノース部分を開裂しアルデヒド基を形成して、これに薬物をシッフ塩基として結合させることができる。また、同じくアミノ基を有した薬物の場合、カルボキシル基とアミド結合させること、さらには、水酸基をブロムシアンで活性化した後アミノ基を有した薬物を主としてイソウレア結合させることも可能である。なお、以上においてアミノ基を有する薬物としては、それ自体にアミノ基を有するもの、さらには結合の目的で新たにアミノ基を付したものであってもよい。更に、アミノ基を有する適当なスパーサーを選択してこれを付加することによりアミノ基を有する薬物に相当するものとしてもよい。

本発明の第一の態様によるカルボキシメチルマンノグルカンに医薬化合物を導入した具体的な例は、本発明の第二の態様によるカルボキシメチルマンノグルカン誘導体である。酸アミド結合またはエステル結合を介して医薬化合物が導入された誘導体は、一般式 (I) で表される単位から構成されるカルボキシメチルマンノグルカンまたはその塩と、前記一般式  $\text{HNR}^*1\text{R}^*2$  または一般式  $\text{HOR}^*3$  で表される医薬化合物とを酸アミド結合またはエステル結合形成条件下で反応させて得ることができる。例えば、ダウノルビシンが導入された誘導体は、カルボキシメチルマンノグルカンとダウノルビシン塩酸塩とを、例えばホウ酸緩衝液 (pH8) 中で、縮合剤としての 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC) の存在下に反応させ、エタノールを用いて沈殿させて得ることができる。また、配位結合を介して医薬化合物が導入された誘導体は、例えば白金錯体であるシス-ジニトレートジアンミン白金 (II) とカルボキシメチルマンノグルカンとを水溶液中で反応させて、透析後、エタノールで沈殿させて得ることができる。

本発明の第三の態様による酸化カルボキシメチルマンノグルカンは、一般式 (I) で表される単位から構成されるカルボキシメチルマンノグルカンを経過ヨウ素酸などで酸化して開環することによって得ることができる。まず、このカルボキシメチルマンノグルカンに酸化剤（例えば過ヨウ素酸またはそれらの塩）を氷冷下に加え、室温または室温以下の温度で穏やかに反応させる。酸化カルボキシメチルマンノグルカンは、例えば反応液を水に対して透析し、析出助剤としての酢酸ナトリウムを加えて、エタノール中に滴下して析出沈殿として得ることができる。ここで、加える過ヨウ素酸またはその塩の量を変化させることによって分枝マンノース残基と主鎖グルコース残基とを種々の程度にアルデヒド化することが可能であり、それによって所望の量の医薬化合物が結合し得る担体とすることができる。その他、反応時間、反応温度によってもアル

デヒド化の程度を制御することが可能である。なお、アルデヒド化については Inoue K. et al., Carbohydrate Res. 123, 305-314 (1983) の記載を参照することができる。

このようにして得た酸化カルボキシメチルマンノグルカンに、一般式  $\text{H}_2\text{NR}^*4$  で表される医薬化合物をシッフ塩基型結合形成条件下で反応させて、医薬化合物が担持された誘導体を得ることができる。例えば、医薬化合物としてダウノルビシンが導入された誘導体は、ダウノルビシン塩酸塩とホウ酸緩衝液 (pH8) - エタノール混合溶液中で反応させることによって得ることができる。

本発明の第四の態様によるカルボキシメチル開環マンノグルカンは、マンノグルカンを経過ヨウ素酸などで酸化して開環し、開環によって形成されたアルデヒド基を還元してヒドロキシメチル基とし、更にこのヒドロキシメチル基の一部または全部にカルボキシメチル基を導入することによって得ることができる。例えば、マンノグルカンの水溶液に酸化剤（例えば過ヨウ素酸ナトリウム）を加え、遮光下に室温または室温以下の温度で、穏やかに反応させ、反応後に水に対して透析する。次に透析内液に水酸化ホウ素ナトリウムを加えて反応させ、反応液の pH を 5、続いて 7 に調整し、水に対して透析した後、濃縮することによって開環されたマンノグルカンのポリアルコール体を得ることができる。このポリアルコール体を水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、モノクロル酢酸を加え室温で反応させた後、反応液の pH を 8 に調整し、エタノール中に注加すれば、カルボキシメチル開環マンノグルカンを得ることができる。

さらにこのようにして得たカルボキシメチル開環マンノグルカンに、上記第二の態様のカルボキシメチルマンノグルカン誘導体の場合と同様に、医薬化合物を導入することができる。

#### 【実施例】

##### 参考例

以下の実施例での原料として使用したマンノグルカンはミクロエロバスポリア・グリゼア（大阪醸造研究所寄託番号: IF012518）を生産菌として以下のように製造した。

GC 培地（グルコース 2%、ペプトン 0.5%、コーンステイーブリカー 0.5%、酵母抽出液 0.3%、塩化ナトリウム 0.5%、炭酸カルシウム 0.3%、寒天 1.5%; pH7.0）100ml を含む坂口フラスコに本菌株をスラントにより接種し、28℃ で 5 日間振盪培養し、その 2ml を GC 培地 100ml を含む坂口フラスコに接種し、同様に 3 日間培養した。この培養液 200ml を 20L の生産培地（グルコース 3%、コーンステイーブリカー 2%; pH7.2）を含む 30L ジャーファーマンターに接種し、28℃ で 92 時間通気攪拌（10L/min, 250rpm）しながら培養した。なお、培養中の消泡剤としてアデカノール LG805（旭電化）を使用した。次に得られた培地を 80℃ で 20 分加熱した後に室温に冷却し、濾過し

た。この濾液をダイアイオンPA306 (Cl<sup>-</sup>型のカラムに通し、その通過液に0.5Lの10%セチルピリジニウムと1.0Lの0.5Mホウ酸緩衝液 (pH10) を加えた。生じた沈殿を集め、水洗した後に2%酢酸 (2.0L) に溶解し、エタノール (6.0L) を加え、生ずる沈殿を集めた。この沈殿をエタノールで洗った後に、0.02%酢酸ナトリウム水溶液 (3.0L) に溶解し、その遠心上澄液からエタノールで再び沈殿せしめ、集めた沈殿を75%エタノール、エタノール、アセトンの順で洗浄し、五酸化リン上50℃で8時間真空乾燥し、目的のマノグルカン36gを得た。得られたマノグルカンの分子量 (ゲル濾過法/標準物質: デキストラン、カラム: G5000PW) は約  $1 \times 10^6$  であった。

#### 実施例1

前記調製例1で得たマノグルカン (500mg) に水 (20ml) と水酸化ナトリウム (1.05g) を冷却下に加えて透明な溶液を得た。この溶液にモノクロル酢酸 (1.5g) を冷却下に加え、溶解した後に室温で20時間攪拌し反応させた。これに酢酸を加えて反応液のpHを8に調整した後に、メタノール (80ml) 中に注ぎ、生成した白色沈殿を濾取した。この沈殿をメタノールとアセトンで順次洗った後に、真空乾燥してカルボキシメチルマノグルカン481mgを得た。この物質をCM-1と命名するとともに次に示す方法により糖残基あたりの置換度 (DS) を測定したところ、DSは0.08であった。

#### 置換度の測定

置換度 (DS) は遊離酸型について次のような逆滴定を行うことによって求めた。すなわち、まず上記のようにして得たカルボキシメチルマノグルカン70%硝酸/メタノール (1:10V/V) と3時間室温で振盪し、メルチレッドを指示薬として80%メタノールおよびメタノールで洗浄し、乾燥して試料とする。次にこの試料を所定過剰量の0.1N水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、フェノールフタレンを指示薬として0.1N塩酸で逆滴定した。試料の採取量がS (mg)、0.1N水酸化ナトリウムの所定過剰量がA (ml)、0.1N塩酸の逆滴定量がB (ml) とすると、DSは次式 (I) によって求めた。

$$DS = 16.2 (A - B) / [S - 5.8 (A - B)]$$

#### 実施例2~4

実施例1における水酸化ナトリウムおよびモノクロル酢酸のそれぞれの使用量を表1に記載の通りに換えて使用した以外は実施例1の記載と同様に実施した。

実施例1~4において得られた物質の収量、置換度および命名を表1に示す。

表 1

| 実施例 | NaOH (g) | MCA (g) | 収量 (mg) | 置換度 (DS) | 命名   |
|-----|----------|---------|---------|----------|------|
| 1   | 1.05     | 1.5     | 481     | 0.08     | CM-1 |
| 2   | 1.75     | 2.5     | 503     | 0.17     | CM-2 |
| 3   | 2.45     | 3.5     | 524     | 0.31     | CM-3 |
| 4   | 3.50     | 5.0     | 598     | 0.53     | CM-4 |

MCA: モノクロル酢酸

#### 10 実施例5

実施例1と同様の方法により調製したCM-4 (置換度: 0.55) の500mgに水20mlと水酸化ナトリウム3.5gを加え、透明な溶液を得た。この溶液にモノクロル酢酸5.0gを冷却下に加えて溶解した後に、室温で20時間反応させた。酢酸で反応液のpHを8に調整した後に、100mlのメタノール中に注加して生成した沈殿を集め、メタノールで洗い、真空乾燥してCM-5 (531mg) を得た。CM-5の置換度は0.81であった。

#### 実施例6

20 実施例5で得たCM-5 (250mg) に水10mlと水酸化ナトリウム1.75gを加え透明な溶液を得た。この溶液にモノクロル酢酸2.5gを冷却下に加えて溶解した後に、室温で21時間反応させた。酢酸で反応液のpHを8に調整した後に、60mlのメタノール中に注加して生成した沈殿を集め、メタノールで洗い、真空乾燥してCM-6 (261mg) を得た。CM-6の置換度は1.0であった。

#### 実験例1

##### (1) 試料と検体

30 実施例1および4で得られたCM-1およびCM-4を試料とした。各試料から動物実験用の検体を用意するにあたって以下の前調製を行った。すなわち、まず、各試料を水に溶解し、0.5M過ヨウ素酸ナトリウムを過ヨウ素酸イオンが試料の糖残基1モルあたり0.1モル相当となる量だけ加え、室温で25時間反応を行った後、4℃で水に対し透析した。次にその内液に酢酸ナトリウムを加え、4倍容のエタノール中に注ぎ、生成した沈殿をエタノールおよびアセトンで洗浄し、乾燥した。最後に得られた粉末をトリチウムラベルした水素化ホウ素ナトリウムと共に2.5mM炭酸ナトリウム水溶液中にて室温で20時間反応させ、冷却下に酢酸でpH5に調整し、水に対して透析し、その内液を凍結乾燥してそれぞれ検体1および検体2とした。

##### (2) 実験方法

##### イ. 腫瘍細胞の維持

Walker256細胞はWistar/S系ラット (6~9週令、♀) の腹腔中に  $3 \sim 5 \times 10^6$  個を投与して、7日毎に継代した。

S-180細胞はICRマウス (4~6週令、♂) の腹腔中に  $2 \sim 5 \times 10^6$  個を投与して、7日毎に継代した。

##### 50 ロ. 担癌動物の作製



Wistar/S系ラット（6週令、♀）の鼠径部皮下に腫瘍細胞 $1.0 \times 10^7$ 個を移植し、6日後にWalker256担癌ラットとして実験に用いた。

ICRマウス（4週令、♂）の鼠径部皮下に腫瘍細胞 $1.5 \times 10^6$ 個を移植し、10日後にS-180担癌マウスとして実験に用いた。

#### ハ、体内分布実験

（Walker256担癌ラット）

実験は $18.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与で6時間までと $10\text{mg}/\text{kg}$ 投与で24時間までの二通りを行った。軽くエーテル麻酔を施した担癌ラットの頸静脈より検体を投与し、所定時間後に軽くエーテル麻酔を行い採血し、検体の血漿中濃度を調べた。なお $18.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与では6時間後に、 $10\text{mg}/\text{kg}$ 投与では24時間後にそれぞれラットを放血死させて検体の腫瘍内濃度及び血漿中濃度を調べた。

（S-180担癌マウス）

担癌マウスの尾静脈より検体を投与し（ $18.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ ）、4時間後にマウスを放血死させて検体の腫瘍内濃度及び血漿中濃度を調べた。

腫瘍内濃度及び血漿中濃度はそれぞれ組織及び血漿を燃焼装置を用いて燃焼し、放射活性を液体シンチレーション法にて測定して求めた。

#### （3）結果

結果を第1図、第2図、表2、表3に示す。

第1図および第2図はWalker256担癌ラットについてそれぞれ $18.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与の場合および $10\text{mg}/\text{kg}$ 投与の場合の血漿中濃度の経時変化を示すグラフである。図中▲印線および○印線はそれぞれ検体1及び検体2における結果を表す。

第1図および第2図より、本発明物質が血中から急速に消失されることはなく、消失速度は小さいことが認められる。

表2および表3はそれぞれ検体1および検体2についての記載の時点における腫瘍内濃度、血漿中濃度および腫瘍組織のKp値（表中において単にKp値と略記する）を示す。なおKp値は次式によって計算される。

$$\text{Kp値} = \frac{\text{組織}1\text{gあたりの検体濃度}}{\text{血漿}1\text{mlあたりの検体濃度}}$$

表2および表3より、本発明物質は癌組織への指向性を有することが認められる。

表

2

|  | 腫瘍内濃度<br>(ng/g) | 血漿中濃度<br>(ng/ml) | Kp値              |
|--|-----------------|------------------|------------------|
| S-180担癌マウス<br>( $18.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、4時間)     | $7.60 \pm 0.49$ | $2.36 \pm 0.086$ | $3.25 \pm 0.30$  |
| Walker256担癌ラット<br>( $18.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、6時間) | $24.4 \pm 3.83$ | $14.1 \pm 1.72$  | $1.73 \pm 0.093$ |

|  | 腫瘍内濃度<br>(ng/g)  | 血漿中濃度<br>(ng/ml) | Kp値             |
|--|------------------|------------------|-----------------|
| Walker256担癌ラット<br>( $10\text{mg}/\text{kg}$ 、24時間) | $18,210 \pm 630$ | $575 \pm 102$    | $35.7 \pm 6.31$ |

表

3

|  | 腫瘍内濃度<br>(ng/g)  | 血漿中濃度<br>(ng/ml)   | Kp値               |
|--|------------------|--------------------|-------------------|
| S-180担癌マウス<br>( $18.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、4時間)     | $5.10 \pm 0.43$  | $22.5 \pm 1.16$    | $0.226 \pm 0.016$ |
| Walker256担癌ラット<br>( $18.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、6時間) | $26.7 \pm 2.35$  | $97.6 \pm 5.78$    | $0.274 \pm 0.017$ |
| Walker256担癌ラット<br>( $10\text{mg}/\text{kg}$ 、24時間)     | $11,050 \pm 619$ | $12,610 \pm 1,110$ | $0.891 \pm 0.094$ |

#### 実験例2

（シッフ塩基型結合によるカルボキシメチルマンノグルカン-ダウノルビシン複合体の合成）

実施例4で得られたCM-4 200mgを水40mlに溶解した。これに過ヨウ素酸ナトリウム21mg（糖残基1モルあたり0.1モルに相当）を少量の水に溶かしたものを氷冷下撹拌しながら加えた。室温で25時間反応させた後に、水に対して透析し、その内液に酢酸ナトリウム200mgを加え、エタノール350ml中へ滴下した。析出した沈殿を集め、乾燥し、アルデヒド化したカルボキシメチルマンノグルカン192mgを得た。このうちの20mgに0.1Mホウ酸緩衝液（pH8.0）4mlを加えて溶解した。これにダウノルビシン塩酸塩16.9mgをエタノール4ml及び0.1Mホウ酸緩衝液（pH8.0）400 $\mu\text{l}$ に溶かした溶液を加え、室温にて一晩反応させた後、反応液にエタノール12mlを加え、析出した沈殿を集め、乾燥し、シッフ塩基型で結合したカルボキシメチルマンノグルカン-ダウノルビシン複合体18mgを得た。この複合体は水溶性であり、ダウノルビシンの含有量は10.5%（重量%）であった。第3図に紫外・可視部吸収スペクトル（濃度：200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、溶媒：水）を示す。

#### 実験例3

（アミド結合を介したカルボキシメチルマンノグルカン-ダウノルビシン複合体の合成）

実験例4で得られたCM-4 20mgを0.1Mホウ酸緩衝液（pH8.0）6mlに溶解した。これにダウノルビシン塩酸塩5.6mgをエタノール4ml及び0.1Mホウ酸緩衝液（pH8.0）1mlに溶かした溶液を加え、更に1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩60mgを水1mlに溶かした溶液を加え、室温にて一晩反応させた後、反応液にエタノール24mlを加え、析出した沈殿を集め、乾燥し、カルボキシル基にアミド結合で結合したカルボキシメチルマンノグルカン-ダウノルビシン複合体20mgを得た。この複合体は水溶性であり、ダウノルビシ

ンの含有量は5.3% (重量%) であった。第4図に紫外・可視部吸収スペクトル (濃度: 500  $\mu\text{g/ml}$ 、溶媒: 水) を示す。

#### 実施例7

マンノグルカン (3.00g) を実施例4の方法に準じてカルボキシメチル化して、3.25gのCM-4 (置換度: 0.53) を得た。このCM-4 (2.00g) を実施例5の方法に準じて更にカルボキシメチル化して、2.22gのCM-5 (置換度: 0.79) を得た。このCM-5 (1.00g) を実施例6の方法に準じて更にカルボキシメチル化して、1.08gのCM-6 (置換度: 1.0) を得た。

#### 実施例8

実施例7で得たCM-6 (500mg) を2-プロパノール (30ml) に懸濁し、これに1gの水酸化ナトリウムを3mlの水にとかして得られる溶液の全量を滴下した後、モノクロル酢酸 (1g) を加え、室温で2時間攪拌しながら反応させた。この反応混合物中の沈殿を集め、2-プロパノール (40ml) / 水酸化ナトリウム (1g) - 水 (2ml) / モノクロル酢酸 (1g) を用いて、再び室温で20時間反応させた。この反応混合物中の沈殿を集め、水 (40ml) に溶解後、メタノール (240ml) 中に注加して生成した沈殿を集め、メタノールで洗い、真空乾燥して620mgのCM-7 (置換度: 2.1) を得た。

#### 実施例9

マンノグルカン (4.00g) を0.1N塩酸 (160ml) に溶解し、80℃で5時間酸分解した後、5N水酸化ナトリウムで中和した。この溶液をエタノール (500ml) 中に注加し、生成した沈殿を集め、エタノールで洗った後、水 (250ml) に溶解した。この溶液をDowex 50W-X2 ( $\text{H}^+$ ) とDowex 1-X2 ( $\text{Cl}^-$ ) の両カラム (各1.5 $\times$ 20cm) に通し、通過液を約150mlまで濃縮した後、エタノール (500ml) 中に注加し、生成した沈殿を集め、エタノールで洗い、真空乾燥して3.48gの低分子マンノグルカンを得た。

この3.30gを1M塩化ナトリウム (330ml) に溶解し、メタノール (330ml) を加え、これを遠心分離して得られた上清にメタノール (110ml) を加え、生成した沈殿を集めた。この沈殿を水 (50ml) に溶解し、エタノール (200ml) 中に注加し、生成した沈殿を集め、エタノールで洗い、真空乾燥して1.92gの低分子マンノグルカン (MG15) を得た。MG15の分子量 (ゲル濾過法/標準物質: デキストラン、カラム: G4000PW<sub>XL</sub>) は約1.5 $\times$ 10<sup>5</sup>であった。

#### 実施例10

マンノグルカン (7.00g) を0.1N塩酸 (280ml) に溶解し、80℃で7.5時間酸分解した後、5N水酸化ナトリウムで中和した。この溶液をエタノール (900ml) 中に注加し、生成した沈殿を集め、エタノールで洗った後、水 (450ml) に溶解した。この溶液をDowex 50W-X2 ( $\text{H}^+$ ) とDowex 1-X2 ( $\text{Cl}^-$ ) の両カラム (各2 $\times$ 20cm) に通し、通過

液を約250mlまで濃縮した後、エタノール (850ml) 中に注加し、生成した沈殿を集め、エタノールで洗い、真空乾燥して6.02gの低分子マンノグルカンを得た。

この3.98gを1M塩化ナトリウム (400ml) に溶解し、これにメタノール (533ml) を加え、生成した沈殿を遠心分離により集めた。この沈殿を水 (100ml) に溶解した後、エタノール (400ml) 中に注加し、生成した沈殿を集め、エタノールで洗い、真空乾燥して2.00gの低分子マンノグルカン (MG10) を得た。また、上記遠心分離の上清にメタノール (267ml) を加え、生成した沈殿を集めた。この沈殿を水 (60ml) に溶解し、エタノール (240ml) 中に注加し、生成した沈殿を集め、エタノールで洗い、真空乾燥して1.26gの低分子マンノグルカン (MG4) を得た。MG10とMG4の分子量 (ゲル濾過法/標準物質: デキストラン、カラム: G4000PW<sub>XL</sub>) は、各々約1 $\times$ 10<sup>5</sup>と約4 $\times$ 10<sup>4</sup>であった。

#### 実施例11

実施例9で得たMG15 (1.50g) を実施例4の方法に準じてカルボキシメチル化して、1.80gのMG15-CM-4 (置換度: 0.52) を得た。この1.40gを実施例5の方法に準じて更にカルボキシメチル化して、1.54gのMG15-CM-5を得た。このMG15-CM-5 (1.00g) を実施例6の方法に準じて更にカルボキシメチル化して1.08gのMG15-CM-6 (置換度: 1.0) を得た。

#### 実施例12

実施例10で得たMG10 (1.80g) を実施例4の方法に準じてカルボキシメチル化して、2.23gのMG10-CM-4を得た。この2.00gを実施例5の方法に準じて更にカルボキシメチル化して、2.25gのMG10-CM-5を得た。このMG10-CM-5 (1.0g) を実施例6の方法に準じて更にカルボキシメチル化して1.07gのMG10-CM-6 (置換度: 1.0) を得た。

#### 実施例13

実施例10で得たMG4 (500mg) と実施例4と同様の方法でカルボキシメチル化して、594mgのMG4-CM-4 (置換度: 0.54) を得た。

#### 実施例14

マンノグルカン (1.50g) を水 (150ml) に溶解した後、8.5%過ヨウ素酸ナトリウム水溶液 (70ml) を加え、遮光下、室温で64時間反応させた。この反応液にエチレングリコール (1.7g) を加え、室温で2時間放置した後、水に対し透析し、この内液に水素化ホウ素ナトリウム (0.75g) を加え、室温で一晩反応させた。この反応液のpHを酢酸で5に調整し、次いで、2N水酸化ナトリウムで7とした後、水に対して透析した。この内液を約10mlまで濃縮後、エタノール (0ml) - アセトン (80ml) の混液中に注加し、生成した沈殿を集め、アセトンで洗い、真空乾燥して、1.29gのマンノグルカンポリアルコール (MG-PA) を得た。

このMG-PA (500mg) に水 (1ml) と水酸化ナトリウム

(2.0g) を冷却下に加えて、透明な溶液を得た。この溶液にモノクロル酢酸 (2.9g) を加え、室温で18時間反応させた。反応液のpHを酢酸で8に調整した後、エタノール (200ml) 中に注加して生成した沈殿を集めた。この沈殿を水 (5ml) に溶解させ、メタノール (125ml) 中に注加し、生成した沈殿を集め、メタノールで洗った後、真空乾燥して、459mgのカルボキシメチル化体を得た。この400mgを2-プロパノール (40ml) に懸濁し、これに0.8gの水酸化ナトリウムを1.6mlの水にとかけて得られる溶液の全量を滴下した後、モノクロル酢酸 (0.8g) を加え、室温で20時間攪拌しながら反応させた。この反応混合物中の沈殿を集め、水 (8ml) に溶解後、メタノール (200ml) 中に注加し、生成した沈殿を集め、メタノールで洗い、真空乾燥して631mgのカルボキシメチル化マンノグルカンポリアルコール (MG-PA-CM) を得た。MG-PA-CMの置換度 (DS) を実施例1と同様にして測定したところ4糖当たり、9であった。ただし、4糖当りのDSは次式によって求めた。

$$DS = 59.4 (A - B) / [S - 5.8 (A - B)]$$

#### 実施例15

実施例7で得た50mgのCM-5と50mgの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDC) とを水 (10ml) に溶解した後、氷冷した。4mgのマイトマイシンC (MMC) を0.8mlの水-エタノール (1:1, v/v) に溶解したものを別に用意し、この全量を上記の氷冷液に加え、0.2N塩酸で反応液のpHを5~6に維持しながら氷冷下、1時間反応させた。この反応液のpHを0.2N水酸化ナトリウムで7.6に調整した後、エタノール (50ml) 中に注加し、生成した沈殿を集め、95%エタノールで洗い、真空乾燥して、CM-5にMMCが結合した複合体 (52mg) を得た。365nmにおける吸光度分析により求めたこの複合体のMMC含量は7.6% (重量%) であった。この複合体の紫外・可視部吸収スペクトル (濃度: 96 µg/ml, 溶媒: 水-エタノール (7:3, v/v)) を第5図として示す。

#### 実施例16

実施例15と同様の方法で、実施例7で得たCM-6 (50mg) と、4mgのMMCとを50mgのEDCを用いて反応させ、MMC含量が7.3% (重量%) の複合体 (50mg) を得た。

#### 実施例17

実施例15と同様の方法で、実施例8で得たCM-7 (50mg) と、10mgのMMCとを150mgのEDCを用いて反応させ、MMC含量が14% (重量%) の複合体 (57mg) を得た。

#### 実施例18

実施例15と同様の方法で、実施例14で得たMG-PA-CM (30mg) と、10mgのMMCとを150mgのEDCを用いて反応させ、MMC含量が24% (重量%) の複合体 (31mg) を得た。この複合体の紫外・可視部吸収スペクトル (濃度: 42 µg/ml, 溶媒: 水-エタノール (7:3, v/v)) とゲル濾過クロマトグラムは各々第6図、第7図に示されるとお

りである。

#### 実施例19

実施例15と同様の方法で、実施例11で得たMG-15-CM-4 (50mg) と、4mgのMMCとを50mgのEDCを用いて反応させ、MMC含量が7.2% (重量%) の複合体 (53mg) を得た。

#### 実施例20

実施例15と同様の方法で、実施例11で得たMG-15-CM-6 (50mg) と、10mgのMMCとを150mgのEDCを用いて反応させ、MMC含量が15% (重量%) の複合体 (48mg) を得た。

#### 実施例21

実施例15と同様の方法で、実施例12で得たMG-10-CM-6 (50mg) と、10mgのMMCとを150mgのEDCを用いて反応させ、MMC含量が17% (重量%) の複合体 (55mg) を得た。

#### 実施例22

実施例15と同様の方法で、実施例13で得たMG4-CM-4 (50mg) と、4mgのMMCとを50mgのEDCを用いて反応させ、MMC含量が7.4% (重量%) の複合体 (46mg) を得た。

#### 実施例23

実施例4の方法に準じて得られたCM-4 (置換度0.53, 1.25g) を水 (300ml) に溶解した。この溶液を、過ヨウ素酸ナトリウム3.32g (糖残基1モル当り3モル当量) を水 (200ml) に溶解した水溶液と混合した。室温で1日反応させた後、1gのエチレングリコールを加え、4時間反応させた。水に対して透析し、内液を濃縮した後、エタノール-アセトン混液 (約1:1) を加え、酢酸ナトリウム飽和メタノール (15ml) を攪拌下にて滴下し、析出した沈殿を集め、アルデヒド化したカルボキシメチルマンノグルカン1.11gを得た。この800mgを0.1Mホウ酸緩衝液 (pH=8.0, 250ml) に溶解し、ダウノルピシン塩酸塩130mgを含むエタノール溶液160mlと混合し、室温で16時間攪拌した。3M塩化ナトリウム溶液 (8ml) を加えた後濾過し、エタノールと混合して析出した沈殿を集めて677mgのカルボキシメチルマンノグルカン-ダウノルピシン複合体を得た。この複合体は水溶性であり、ダウノルピシン含量は10% (重量%) であった。この複合体の紫外・可視部吸収スペクトル (濃度: 330 µg/ml, 溶媒: 水) は第8図に示されるとおりである。

#### 実施例24

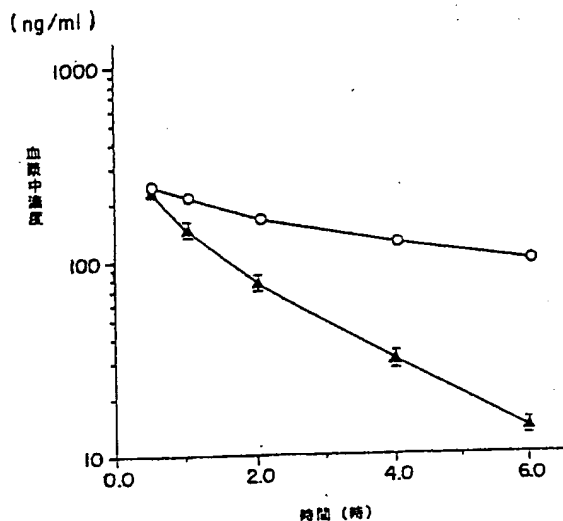
実施例7で得られたCM-6 (800mg) を水 (200ml) に溶解した。この溶液を過ヨウ素酸ナトリウム2.12g (糖残基1モル当り3モル当量) を水 (30ml) に溶解した水溶液と混合した。室温で1日反応させた後、620mgのエチレングリコールを加え、4時間反応させた。水に対して透析し、内液を濃縮した後、エタノール-アセトン混液 (約1:1) を加え、酢酸ナトリウム飽和メタノール (10ml) を攪拌下にて滴下し、析出した沈殿を集め、アルデ

ヒド化したカルボキシメチルマンノグルカン643mgを得た。この600mgを0.1Mホウ酸緩衝液 (pH=8.0、175ml) に溶解し、ダウノルピシン塩酸塩150mgを含むエタノール溶液110mlと混合し、室温で16時間攪拌した。3M塩化ナトリウム溶液 (4.5ml) を加えた後濾過し、エタノールと混合して析出した沈殿を集めて610mgのカルボキシメチルマンノグルカン-ダウノルピシン複合体を得た。この複合体は水溶性であり、ダウノルピシン含量は13% (重量%) であった。この複合体の紫外・可視部スペクトル (濃度:200  $\mu$ g/ml、溶媒:水) は第9図に示されるとおりである。

#### 実施例25

実施例12で得られたMG10-CM-6 (700mg) を水 (175ml) に溶解した。この溶液を、過ヨウ素酸ナトリウム1.86g (糖残基1モル当たり3モル当量) を水 (25ml) に溶解した水溶液と混合した。室温で1日反応させた後、560mgのエチレングリコールを加え、4時間反応させた。水に対して透析し、内液を濃縮した後、エタノール-アセトン混液 (約1:1) を加え、酢酸ナトリウム飽和メタノール (8ml) を攪拌下にて滴下し、析出した沈殿を集め、アルデヒド化したカルボキシメチルマンノグルカン571mgを得た。この571mgを0.1Mホウ酸緩衝液 (pH=8.0、180ml) に溶解し、ダウノルピシン塩酸塩143mgを含むエタノール溶液112mlと混合し、室温で16時間攪拌した。3M塩化ナトリウム溶液 (3ml) を加えた後濾過し、エタノールと混合して析出した沈殿を集めて610mgのカルボキシメチルマンノグルカン-ダウノルピシン複合体を得た。この複合体は水溶性であり、ダウノルピシン含量は12% (重量%) であった。この複合体の紫外・可視

【第1図】



部スペクトル (濃度:200  $\mu$ g/ml、溶媒:水) は第10図に示されるとおりである。

#### 実施例26

白金錯体シス-ジニトラートジアンミン白金 (II) は公知の方法 (例えば、Inorg.Chem., Vol16, P1525 (1977), B.Lippert et al.) で合成した。

実施例14で得たMG-PA-CM (230mg) を水 (7ml) に溶解し、これにシス-ジニトラートジアンミン白金 (II) (24.71mg) を水 (7ml) に溶解した溶液を加え、遮光下、室温で24時間攪拌した。未反応原料白金錯体が残存していないことをゲル濾過クロマトグラフィーで確認した後、反応液を水に対して1液透析した。内液を1N NaOHを用いてpHを6.5に調整した後、約10mlに濃縮し、次いでエタノール (80ml) を加え、析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、シス-ジアンミン白金 (II) 錯体複合体 (218mg、白金含量 (原子吸光法による) :5.80%) を得た。この複合体のゲル濾過溶出パターン (検出:280nmにおける紫外外部吸収) を第11図として示す。

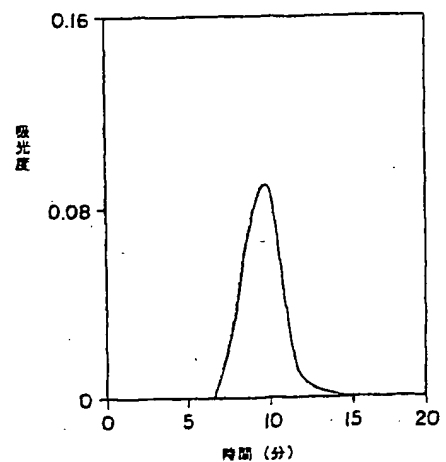
#### 実施例27

実施例7で得たCM-6 (14.6mg) と、シス-ジニトラートジアンミン白金 (II) (2.12mg) とより、実施例26と同様にして、シス-ジアンミン白金 (II) 錯体複合体 (12.6mg、白金含量:7.04%) を得た。

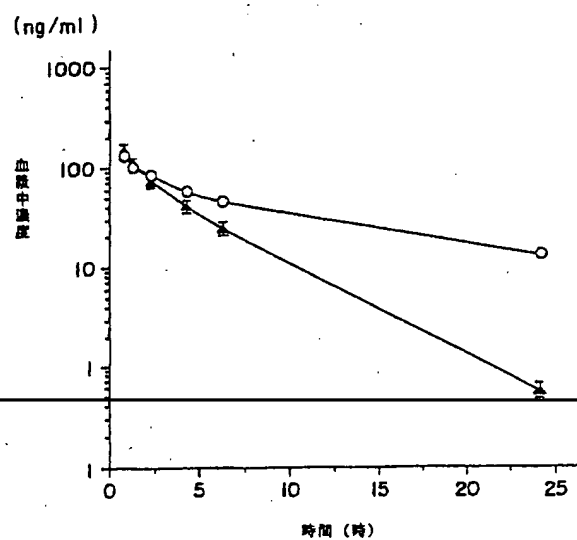
#### 実施例28

実施例8で得たCM-7 (211mg) と、シス-ジニトラートジアンミン白金 (II) (24.7mg) とより、実施例26と同様にして、シス-ジアンミン白金 (II) 錯体複合体 (205mg、白金含量:6.60%) を得た。

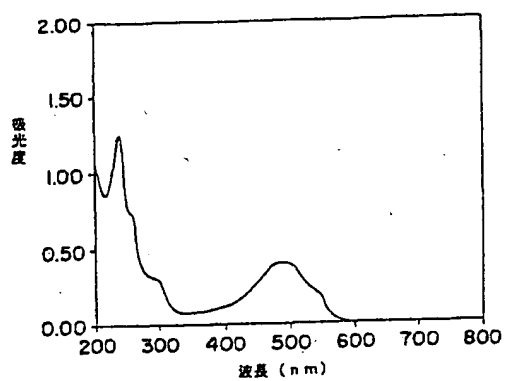
【第7図】



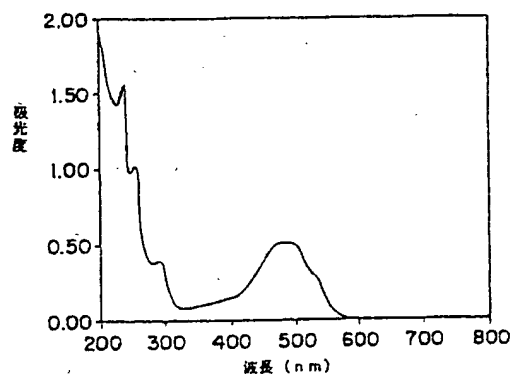
【第2図】



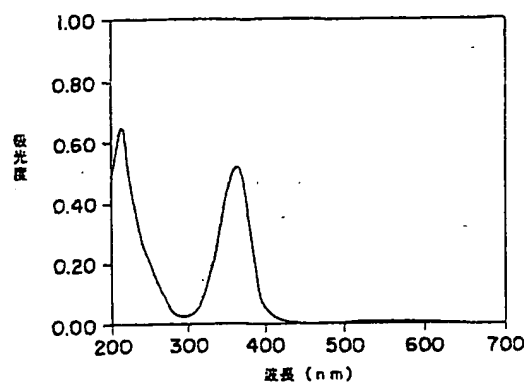
【第3図】



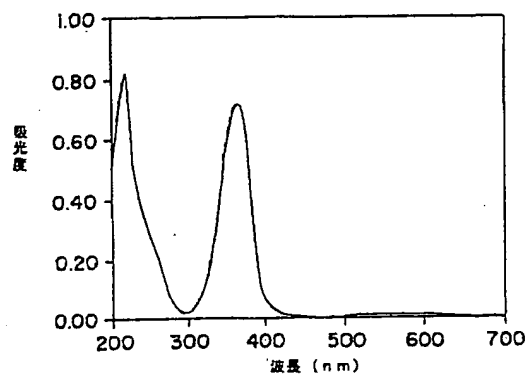
【第4図】



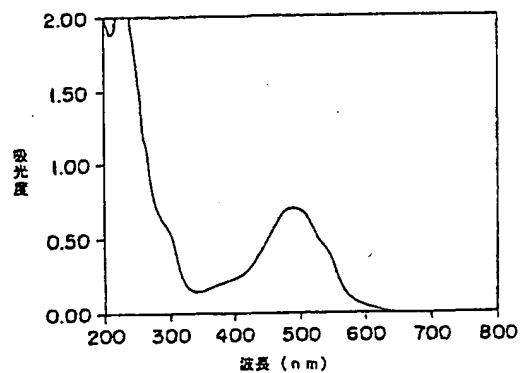
【第5図】



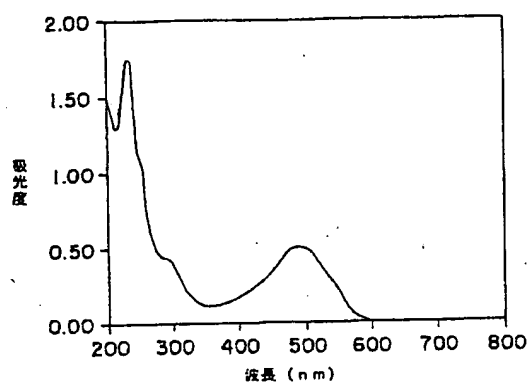
【第6図】



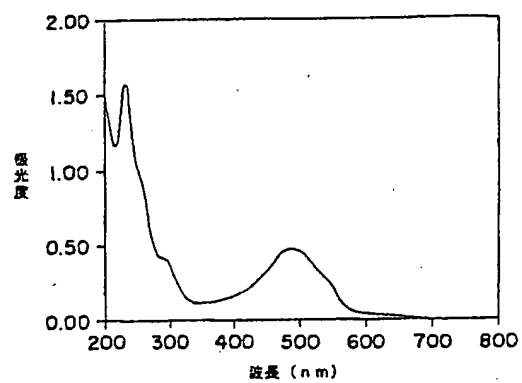
【第8図】



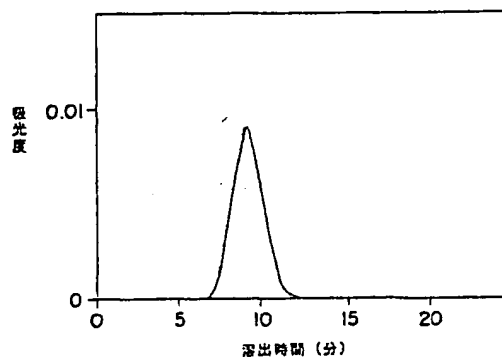
【第9図】



【第10図】



【第11図】



フロントページの続き

(72)発明者 矢野 敏郎  
千葉県柏市あけぼの3-1-8-410

---